

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

04.01.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年12月26日

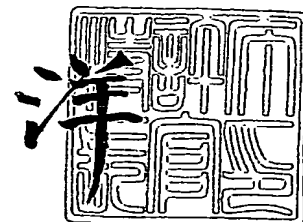
出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-435677  
[ST. 10/C]: [JP2003-435677]

出 願 人  
Applicant(s): 日本新薬株式会社

2005年 2月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



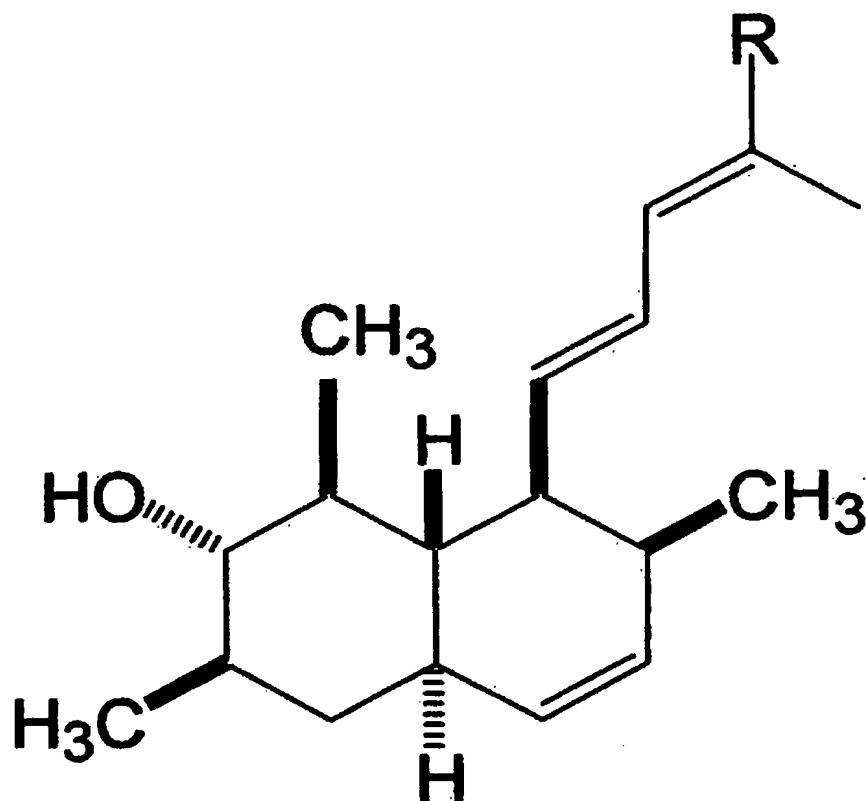
【書類名】 特許願  
【整理番号】 S-564N  
【提出日】 平成15年12月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 9/46  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 1 4 番地 日本新薬株式会社内  
    【氏名】 山田 直義  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000004156  
    【氏名又は名称】 日本新薬株式会社  
    【代表者】 初山 一登  
【代理人】  
    【識別番号】 100104802  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 尚人  
    【電話番号】 075-321-9086  
【代理人】  
    【識別番号】 100126446  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 榊井 康司  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 005234  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0300385  
    【包括委任状番号】 0310755

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

次の一般式 [1] で表されるオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩。

【化 1】



[ 1 ]

(Rは、カルボキシ、ヒドロキシメチル、アルコキシメチル、アルコキシカルボニル又は  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$  を表す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は、同一又は異なって、水素、フェニル又はアルキルを表し、かかるアルキルは、1) ハロゲン、アルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、若しくは、アルコキシで置換されていてもよいフェニル、2) 2-ピリジル、3) 3-ピリジル、又は、4) 4-ピリジルで置換されていてもよい。)

【請求項 2】

一般式 [1] で表される化合物が、N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミドである、請求項 1 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する ICAM-1 発現抑制剤。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する炎症性疾患治療剤。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する関節リウマチ治療剤。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する免疫抑制剤。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する抗癌剤。

## 【書類名】 明細書

【発明の名称】 オクタヒドロナフタレン誘導体及び医薬

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、オクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩、及び、オクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞接着分子とは、細胞表面に存在し、細胞—細胞および細胞—細胞間基質の接着を仲介する分子群である。接着分子を介した接着という現象は単に細胞の接着にとどまらず、細胞の情報伝達や活性化にも関与しており、炎症・免疫反応をはじめ生体防御反応の中で重要な役割を担っている。炎症に重要な役割を果たす炎症性白血球は、血管内皮に発現した細胞接着分子に接着した後、血管内皮細胞の間をくぐりぬけて組織内部に浸潤し、そこで様々な炎症性メディエーター等を放出することにより、炎症の発症・拡大に重要な役割を果たしている。現在、種々の細胞接着分子の存在が知られているが、中でもICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) は、炎症が生じている血管内皮に著しく発現しており、その関与が強く示唆されている (例えば、非特許文献1 参照。 )。

## 【0003】

ICAM-1はT細胞レセプター、CD4、CD8、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) などと同様免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子で、糖鎖付加の違いにより、76~114kDaを示すタンパク質である。ICAM-1は当初LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) のリガンドと考えられていたが (例えば、非特許文献2~3 参照。 )、その後、Mac-1やCD43のリガンドであることも明らかにされた (例えば、非特許文献4~5 参照。 )。

## 【0004】

各種動物モデルを用いた検討から、関節リウマチ (例えば、非特許文献6~7 参照。 ) のみならず、糸球体腎炎 (例えば、非特許文献8 参照。 )、臓器移植における拒絶反応 (例えば、非特許文献9 参照。 )、肺炎 (例えば、非特許文献10 参照。 )、心筋炎 (例えば、非特許文献11 参照。 )、喘息 (例えば、非特許文献12 参照。 ) 及び潰瘍 (例えば、非特許文献13 参照。 ) においても抗ICAM-1抗体による治療の有効性が認められたことから、ICAM-1の発現を制御することが種々の疾患の治療につながる可能性が考えられる。

## 【0005】

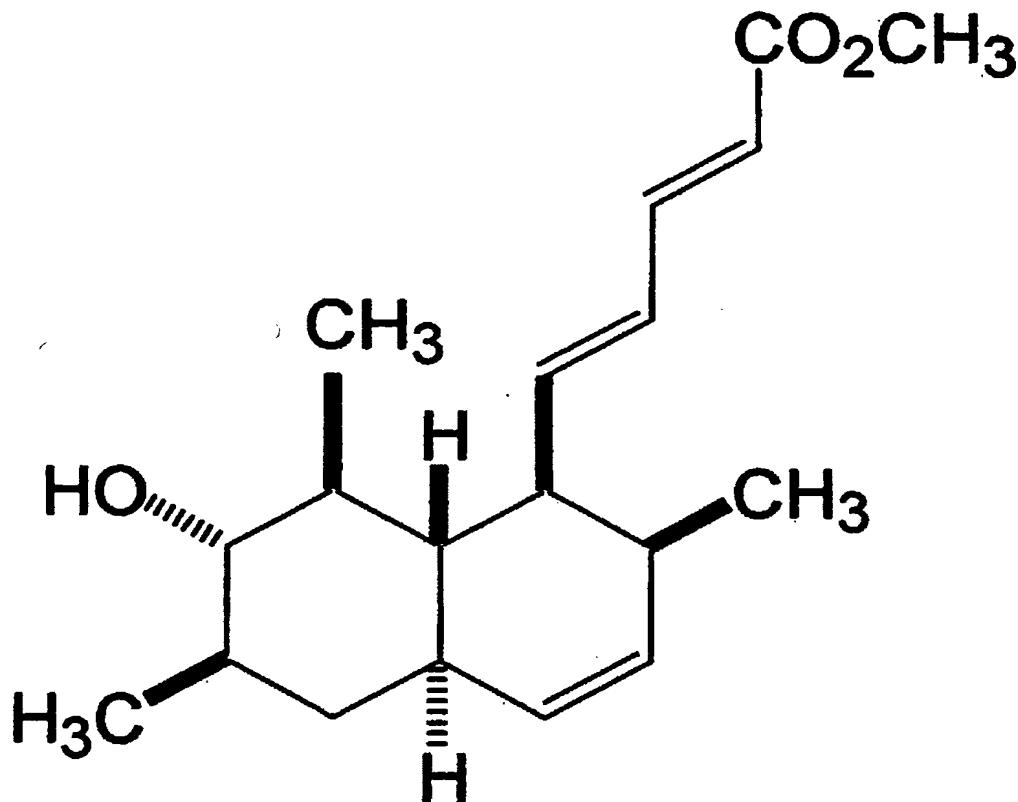
今までに、ICAM-1のアンチセンスや抗体が、リウマチや炎症性疾患の治療剤、免疫抑制剤として開発されてきたが、上市された医薬はまだ存在せず、新たな作用機序を有する新規な炎症性疾患治療剤の創製が期待されている。

## 【0006】

次の式〔2〕で表されるCoprophilinは、抗菌作用を有していることが報告されているが、ICAM-1発現抑制作用、抗炎症作用、免疫抑制作用、細胞増殖抑制作用については全く記載されていない (例えば、非特許文献14 参照。 )。

## 【0007】

【化2】



[2]

- 【非特許文献1】 Patarroyo M, et al.: Lancet., 1989, Nov 11, 2(8672), 1139-42
- 【非特許文献2】 Dustin ML, et al.: Annu. Rev. Immunol., 1991, 9, 27-66
- 【非特許文献3】 Springer TA: Nature, 1990, 346, 425-434
- 【非特許文献4】 Diamond MS, et al.: J. Cell. Biol., 1990, 111, 3129-3139
- 【非特許文献5】 Rosenstein Y, et al.: Nature, 1991, 354, 233-235
- 【非特許文献6】 Iigo Y, et al.: J. Immunol., 1991, 147, 4167-4171
- 【非特許文献7】 Kavanaugh AF, et al.: Arthritis. Rheum., 1992, 35(Sppul.), 53
- 【非特許文献8】 Kawasaki K, et al.: J. Immunol., 1993, 150, 1074-1083
- 【非特許文献9】 Cosimi AB, et al.: J. Immunol., 1990, 144, 4604-4612
- 【非特許文献10】 Barton RW, et al.: J. Immunol., 1989, 143, 1278-1282
- 【非特許文献11】 Seko Y, et al.: J. Clin. Invest., 1993, 91, 1327-1336
- 【非特許文献12】 Wegner CD, et al.: Science, 1990, 247, 456-459
- 【非特許文献13】 Wallance JL, et al.: Am. J. Physiol., 1993, 265, G933-998
- 【非特許文献14】 Ondeyka JG, et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 3439-344

2

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、ICAM-1発現阻害作用を有する新規なオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩を提供することにある。さらに、本発明は、細胞増殖抑制作用を有するオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩を提供することを目

的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

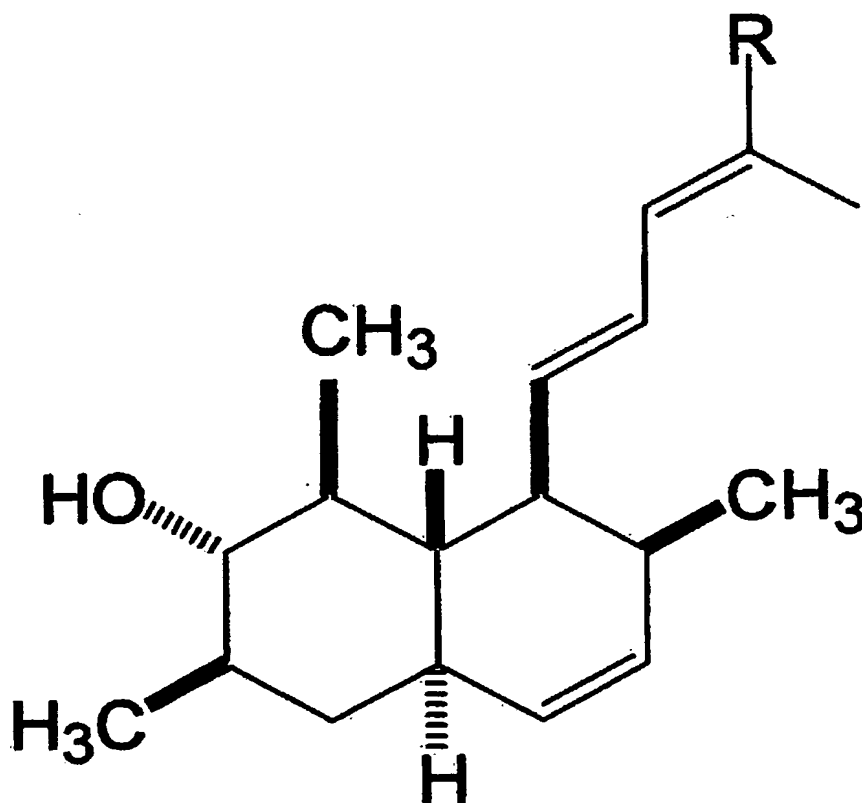
本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩が上記目的を達成することを見出し、本発明を完成した。

【0010】

本発明としては、次の一般式〔1〕で表されるオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩（以下、本発明化合物という）を挙げることができる。

【0011】

【化3】



〔1〕

(Rは、カルボキシ、ヒドロキシメチル、アルコキシメチル、アルコキシカルボニル又は $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ を表す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は、同一又は異なって、水素、フェニル又はアルキルを表し、かかるアルキルは、1) ハロゲン、アルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、若しくは、アルコキシで置換されていてもよいフェニル、2) 2-ピリジル、3) 3-ピリジル、又は、4) 4-ピリジルで置換されていてもよい。)

上述のオクタヒドロナフタレン誘導体の中で、N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミドが好ましい。

【0012】

また、本発明としては、本発明化合物を有効成分として含有する医薬組成物、例えば、ICAM-1発現阻害剤、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤、細胞増殖抑制剤を挙げることができる。具体的には、例えば、関節リウマチ治療剤、抗癌剤を挙げることができる。

【0013】

以下に本発明を詳述する。

## 【0014】

本発明において「アルキル」としては、直鎖状又は分枝鎖状の炭素数1～10個のもの、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、n-ヘプチル、イソヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシルが挙げられる。特に、直鎖状の炭素数1～3のものが好ましい。

## 【0015】

「ジアルキルアミノ」、「アルコキシ」、「アルコキシメチル」及び「アルコキシカルボニル」のアルキル部分としては、上記のアルキルが挙げられる。

## 【0016】

「ハロゲン」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。

## 【0017】

「ICAM-1発現抑制剤」とは、細胞接着分子の一つであるICAM-1の発現を抑制する薬剤をいう。具体的には、例えば、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤を挙げることができる。

## 【0018】

「炎症性疾患治療剤」は、炎症を伴う疾患であれば特に限定されない。例えば、関節リウマチ、糸球体腎炎、肺炎、心筋炎、喘息、潰瘍、等の炎症を伴う疾患の治療剤を挙げることができる。

## 【0019】

「細胞増殖抑制剤」とは、細胞の増殖を抑制することによって種々の疾患を治療する薬剤をいい、例えば、抗癌剤を挙げることができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0020】

本発明化合物は、日本国大阪府茨木市のリターより分離したNFS-932株（受託番号：FERM P-19500、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター）の産生物及びその誘導体並びにそれらの医薬上許容される塩である。

## 【0021】

NFS-932株の培養

NFS-932株の培養は、それ自身公知の方法により行うことができる。例えば、ジャガイモ・ショ糖寒天培地上に生育させたNFS-932の薄片を、滅菌した加工大麦及び蒸留水の入った三角フラスコに植菌し、24℃で一週間静置して前培養とする。次いでこの培養物を、滅菌した加工大麦及び蒸留水の入ったシャーレに種菌として加えてよく混合し、24℃で3週間静置して本培養することにより行うことができる。

## 【0022】

菌産生物の単離

産生物の単離は、それ自身公知の方法により行うことができる。例えば、加工大麦培養物にメタノールを加え、ホモジナイザーで粉碎・抽出した後、吸引濾過する。濾液に等量の水を加え、吸着カラムクロマトグラフィーに供し、吸着物をメタノール/水で溶出し、活性画分を減圧乾固する。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム/メタノールで溶出し、活性画分を減圧乾固する。残渣を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン/酢酸エチルで溶出し、活性画分を減圧乾固する。残渣を高速液体クロマトグラフィーにて精製し、分取画分をそのまま静置することにより結晶を析出させ、これを濾取・乾燥することにより、菌産生物を無色結晶として得ることができる。

## 【0023】

菌産生物の物理化学的性質

性状：無色結晶

融点：216.0～218.6℃

溶解性：メタノール・クロロホルム・アセトンに可溶

水・ヘキサンに不溶



R<sub>f</sub> 値 (TLCアルミニウムシート、シリカゲル60 F<sub>254</sub>、メルク製) :

トルエン-酢酸エチル-90%ギ酸 (5:4:1) 0.66

クロロホルム-アセトン-2-プロパノール (85:15:20) 0.72

分子式: C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>

元素分析値 (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>として) :

計算値 (%) C:74.96 H:9.27

実測値 (%) C:74.79 H:9.27

EI-MS (M<sup>+</sup>) : m/z 304

比旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +58.71^\circ$  (c 0.998, CH<sub>3</sub>OH)

IR (KBr) :  $\nu$  1667 cm<sup>-1</sup>

#### 菌産生物の平面構造

菌産生物の分子式は、EI-MS (m/z 304, M<sup>+</sup>) 及び元素分析 (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> H:9.27%, C:74.96%; found H:9.27%, C:74.79%) より C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> と決定した。さらにこの分子式を<sup>13</sup>C NMRスペクトル及びDEPTスペクトル (DMSO-d<sub>6</sub>) により確証した。すなわち、菌産生物は4個のメチル基、1個のメチレン基、12個のメチン基 (7個のアリファティックメチンと5個のオレフィニックメチン)、1個の4級オレフィン炭素 ( $\delta$  125.03ppm) 及び1個のカルボキシル炭素 ( $\delta$  169.24ppm, IR:  $\nu$  1667cm<sup>-1</sup>) により構成されることが明らかとなり、分子式と同数の合計19本の<sup>13</sup>C NMRシグナルが観測された (表1を参照)。

#### 【0024】

次いで、各種NMRスペクトル (DMSO-d<sub>6</sub>) のデータより、その平面構造を以下の通り決定した。まず<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYスペクトルにより、全ての<sup>1</sup>Hシグナルを帰属した (表1を参照)。特徴的なシグナルとして、4本のメチルダブレット (うち1本は遠隔カップリングによるもの)、4本のオレフィンダブルダブレットと1本のオレフィンダブルダブレット (<sup>13</sup>C NMRスペクトルにおける1本の4級オレフィン炭素シグナルの存在を考え合わせると、計3個の二重結合) が観測された。また $\delta$  4.38ppmおよび $\delta$  12.13ppmのシグナルは、HMQCスペクトル (図1を参照) において<sup>13</sup>Cとの相関ピークが観測されなかったことから、酸素原子に結合していると予想された。このうち $\delta$  4.38ppmのシグナルはダブルレットであることから2級の水酸基であることが示唆され、もう一方の $\delta$  12.13ppmのシグナルはその化学シフトからカルボキシル基であることが示唆された。分子式 (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>) より不飽和度は6となるが、3個の二重結合と1個のカルボニルの存在が示唆されるため、二環性の化合物であると推測された。

#### 【0025】

菌産生物の<sup>1</sup>H及び<sup>13</sup>C NMR 化学シフト (DMSO-d<sub>6</sub>) を表1に示す。なお、表中の「Position」は、図2の平面構造における炭素番号を示す。

#### 【0026】

【表1】

表1 菌産生物の  $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR 化学シフト ( $\text{DMSO}-d_6$ )

Position	$\delta\text{C}(\text{ppm})$	Type	$\delta\text{H}(\text{ppm})$ [mult, $J(\text{Hz})$ ]
1	43.32	CH	1.17 [1H, m]
2	80.23	CH	2.46 [1H, m]
3	39.23	CH	1.37 [1H, m]
4	39.11	$\text{CH}_2$	0.84 [1H, q, 12.3] 1.67 [1H, dt, 13.2/3.3]
5	41.63	CH	1.79 [1H, m]
6	131.38	CH	5.41 [1H, dd, 11.1/1.8]
7	132.25	CH	5.56 [1H, ddd, 9.6/4.5/2.7]
8	36.31	CH	2.11 [1H, m]
9	49.10	CH	2.46 [1H, m]
10	45.11	CH	1.02 [1H, q, 9.9]
11	147.96	CH	6.20 [1H, dd, 15.3/10.5]
12	124.07	CH	6.33 [1H, dd, 15.0/11.1]
13	137.92	CH	7.11 [1H, dd, 11.1/1.5]
14	125.03	C	
15	169.24	CO	
16	18.14	$\text{CH}_3$	0.99 [3H, d, 6.6]
17	19.33	$\text{CH}_3$	0.94 [3H, d, 6.3]
18	16.22	$\text{CH}_3$	0.91 [3H, d, 7.2]
19	12.48	$\text{CH}_3$	1.83 [3H, d, 1.2]
2-OH			4.38 [1H, d, 7.2]
COOH			12.13 [1H, br]

次に $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY及びHMQCスペクトルを用いて各原子のつながりを導き出したところ、3つの分離したスピンシステムの存在が明らかとなった(図2の太線を参照)。続いて、溶媒シグナルに対する重なりのため相関がはっきりしなかったH-2及びH-9について、HMBCスペクトル(図3を参照)を用いて相関を求めた(図2の矢印を参照)。まず、ヒドロキシルプロトン( $\delta$ 4.38ppm)と相関がある方のプロトン(H-2)については、その結合する炭素(C-2、 $\delta$ 80.23ppm)に対して、2-OH、H-4、H-16、H-17からの相関シグナルが観測されたことから、H-2であると結論づけた。もう一方のプロトン(H-9)については、その結合する炭素(C-9、 $\delta$ 49.10ppm)に対して、H-10、H-11、H-12、H-18からの相関シグナルが観測されたことから、H-9であると判断した。なお、このように一旦H-2とH-9の両シグナルを区別できれば、これらのシグナルを適切に相関づけることができた(図2の点線を参照)。残るカルボキシル基の位置は、カルボニル炭素(C-15)に対してH-13及びH-19から相関があることから、C-14に結合していると結論した。

【0027】

二重結合の幾何異性については、相当するオレフィンプロトンの結合定数から類推した。まず環内オレフィンについては、H-6/H-7間の結合定数が $J=11.1\text{Hz}$ であることから、これらのプロトンは互いにcis(Z配置)であると決定した。また、側鎖の2つの二重結合のうち縮合環に近い方(C-11/C-12)は、H-11/H-12間の結合定数が $J=15.3\text{Hz}$ であることから、これらのプロトンは互いにtrans(E配置)であると結論した。残る側鎖中の末端側の二重結合(C-13/C-14)については、一方の炭素が4級炭素であることから、オレフィンプロトンの結合定数では判定できない。そこで、この三置換オレフィンに結合しているメ

チル基 (C-19) の $^{13}\text{C}$  NMRシグナルの化学シフトから判断することにした。すなわちこの値が $\delta$  12.48ppmと高磁場側にシフトしていることから、このメチル基とオレフィンプロトン (H-13) とが互いにtransの関係にある (すなわちE配置) と決定した。この結果は、NOESYスペクトル (図4を参照) によっても支持されている。

#### 【0028】

以上、物理化学的性質及びNMRによる構造解析から、菌産生物の平面構造式を図1に示す通り決定した。従って、菌産生物は、(2E, 4E)-5-(7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル)-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸である。

#### 菌産生物の相対立体構造

菌産生物の相対立体構造を決定するに際しては、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルにおいてシグナルの重なりが多く、さらに溶媒 (DMSO- $d_6$ ) シグナル付近の結合定数を解読することが困難であったため、側鎖末端のカルボン酸をメチルエステルに誘導してから実施することにした。該メチルエステル体 (以下、エステル体という) は、公知の方法により製造することができ、その物性値は以下の通りである。

#### 【0029】

元素分析値 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ として) :

計算値 (%) C:75.43 H:9.50

実測値 (%) C:75.10 H:9.44

比旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +71.64^\circ$  (c 0.469,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

IR (KBr) :  $\nu$  1709  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.95[3H, d, 7.0(H-18)], 0.96[1H, q, 11.8(H-4<sub>ax</sub>)], 1.04[3H, d, 6.2(H-16)], 1.08[3H, d, 6.4(H-17)], 1.08[1H, q, 9.7(H-10)], 1.32[1H, m(H-1)], 1.52[1H, m(H-3)], 1.75[1H, dt, 12.8/3.4(H-4<sub>eq</sub>)], 1.85[1H, m(H-5)], 1.93[3H, d, 1.4(H-19)], 2.20[1H, m(H-8)], 2.49[1H, td, 9.4/5.6(H-9)], 2.74[1H, t, 8.8(H-2)], 3.75[3H, s(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)], 5.44[1H, dt, 9.4/1.8(H-6)], 5.59[1H, ddd, 9.6/4.0/2.6(H-7)], 6.14[1H, dd, 14.8/9.6(H-11)], 6.27[1H, dd, 15.0/10.6(H-12)], 7.20[1H, dq, 10.6/1.4(H-13)]

エステル体のデカリン環部位の相対立体配置は、 $^1\text{H}$  NMRシグナルのビシナル結合定数 (上記物性値を参照) とNOESYスペクトルのデータを合わせて決定した。H-2メチンプロトン ( $\delta$  2.74ppm) は結合定数J=8.8Hzを持つトリプレットであることからアキシャルに配向しており、必然的に隣接するH-1及びH-3についてもそれぞれアキシャル配向であることが結論できる。すなわち、シクロヘキサン環はイス型コンホメーションをとっており、C-1、C-3位のメチル基及びC-2位のヒドロキシル基はエクアトリアル配位である。一方、H-2からはH-4アキシャルプロトン (H-4<sub>ax</sub>,  $\delta$  0.96, q, J=11.8Hz) 及びH-10 ( $\delta$  1.08, q, J=9.7Hz) に対してNOEが観測され、さらにH-4<sub>ax</sub>とH-10の間でもNOEが観測されたことから、これらのプロトンは互いに1, 3-ジアキシャルの関係にあると結論できる。H-4<sub>ax</sub>及びH-10はいずれも大きな結合定数を持つカルテットであることから、これらに隣接するH-5及びH-9も同様にアキシャルに配向している。このことは、H-9とH-1、H-5の間にNOEが観測されたことから支持される。同様のNOE効果がH-8とH-9の間でも観測され、逆にH-8とH-10の間にNOEが観測されなかったことから、H-8はエクアトリアルに配向していると結論づけることができる。H-8は、H-5 (弱い) 及びH-7 (強い) に対してもNOEを示したが、前者のNOEは、シクロヘキセン環の擬イス型/ボート型コンホメーションの反転によって説明することができる。一方のH-9は、側鎖のオレフィンプロトンH-11及びH-12に対してもNOEを示した。

#### 【0030】

以上、NMRによる構造解析から、エステル体のデカリン環部位の相対立体構造を図5に示す通り決定した。

#### 菌産生物の絶対立体構造

菌産生物の絶対立体構造は、エステル体に新Mosher法 (Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4092-4096) を適用して決定し

た。エステル体をS-及びR-MTPAクロリド( $\alpha$ -メトキシ- $\alpha$ -(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド)と反応させることによりR-及びS-MTPAエステルに誘導し、各 $^1\text{H}$  NMRシグナルの化学シフトの差より絶対立体構造を決定した。

#### 【0031】

エステル体のR-MTPAエステル体の物性値は以下の通りである。

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.80[3H, d, 6.2(H-16)], 0.89[3H, d, 6.2(H-17)], 0.95[3H, d, 7.4(H-18)], 1.07[1H, q, 12.0(H-4<sub>ax</sub>)], 1.16[1H, q, 10.0(H-10)], 1.59[1H, m(H-1)], 1.70[1H, m(H-3)], 1.81[1H, m(H-4<sub>eq</sub>)], 1.87[1H, m(H-5)], 1.91[3H, d, 1.2(H-19)], 2.20[1H, m(H-8)], 2.47[1H, td, 9.4/5.6(H-9)], 3.55[3H, s(MTPA-OCH<sub>3</sub>)], 3.75[3H, s(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)], 4.60[1H, t, 10.0(H-2)], 5.44[1H, dt, 9.6/1.4(H-6)], 5.61[1H, ddd, 9.2/4.0/2.6(H-7)], 6.09[1H, dd, 15.0/9.4(H-11)], 6.23[1H, dd, 15.0/10.2(H-12)], 7.16[1H, dd, 10.6/1.4(H-13)], 7.40[3H, m(MTPA-Ph)], 7.61[2H, m(MTPA-Ph)]

エステル体のS-MTPAエステル体の物性値は以下の通りである。

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.80[3H, d, 6.4(H-17)], 0.89[3H, d, 6.2(H-16)], 0.96[3H, d, 7.0(H-18)], 1.05[1H, q, 12.0(H-4<sub>ax</sub>)], 1.17[1H, q, 9.8(H-10)], 1.61[1H, m(H-1)], 1.68[1H, m(H-3)], 1.79[1H, m(H-4<sub>eq</sub>)], 1.83[1H, m(H-5)], 1.93[3H, d, 1.0(H-19)], 2.22[1H, m(H-8)], 2.49[1H, td, 9.4/5.6(H-9)], 3.53[3H, s(MTPA-OCH<sub>3</sub>)], 3.76[3H, s(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)], 4.61[1H, t, 10.0(H-2)], 5.44[1H, dt, 9.6/1.4(H-6)], 5.61[1H, ddd, 9.4/4.4/2.6(H-7)], 6.11[1H, dd, 15.0/9.8(H-11)], 6.25[1H, dd, 15.0/10.2(H-12)], 7.18[1H, dd, 10.4/1.4(H-13)], 7.40[3H, m(MTPA-Ph)], 7.61[2H, m(MTPA-Ph)]

両MTPAエステルの $^1\text{H}$  NMRシグナルの化学シフトの差( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ )を求め、菌産生物の構造式中にその値をプロットした(図6)。期待された通り、 $\Delta\delta$ の値は分子の一方(図6中の上方)に正の値が並び、MTPA平面を挟んで反対側(図6中の下方)に負の値が並んだ。これら正/負の符号から、新Mosher法の規則に従って、MTPAエステル化された2級ヒドロキシル基が結合している炭素(C-2)の絶対立体化学をSであると決定した。残りの不斉炭素については、既に明らかにした相対配置に従って、C-2より順次決定した。

#### 【0032】

以上の結果、エステル体の絶対立体構造を、図6に示した通り、1S, 2S, 3R, 5R, 8S, 9S, 10Sであると決定した。従って、菌産生物は、(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸(以下、化合物Aという)である。

#### 【0033】

##### 菌産生物の誘導体

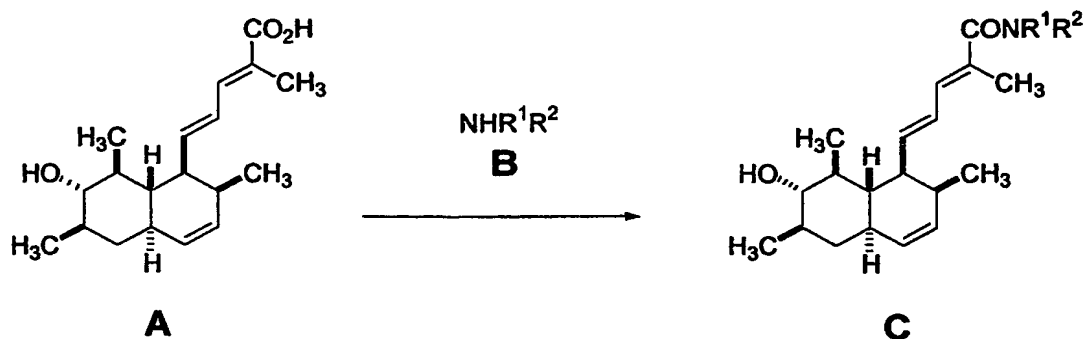
本発明化合物は、上述の菌産生物、及び、公知化合物又は容易に調製可能な中間体から、例えば下記の方法に従って製造することができる。本発明化合物の製造において、原料が反応に影響を及ぼす置換基を有する場合には、原料をあらかじめ公知の方法により適当な保護基で保護した後に反応を行うのが一般的である。保護基は、反応後に、公知の方法により脱離することができる。

#### 【0034】

菌産生物の誘導体であるアミド体は、それ自身公知の方法により容易に製造することができるが、例えば、以下の方法で製造可能である。

#### 【0035】

## 【化4】



本反応は、菌産生物である化合物Aと化合物Bとの縮合反応であって、それ故、縮合反応としてそれ自体知られた公知の方法によって行われる。化合物Aで表されるカルボン酸又はその反応性誘導体と、化合物Bで表されるアミンを反応させることにより、化合物Cを製造することができる。化合物Aの反応性誘導体としては、例えば、酸ハライド（例えば、酸クロリド、酸プロミド）、混合酸無水物、イミダゾリド、活性アミド等、アミド縮合形成反応に通常用いられるものを挙げる事ができる。化合物Aを用いる場合は、縮合剤（例えば、1,1'-オキサリルジイミダゾール、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、シアノホスホン酸ジエチル、ジフェニルホスホリルアジド、よう化 2-クロロ-1-メチルピリジニウム、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート）が使用され、塩基（例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピル-N-エチルアミン、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセ-7-エンの有機塩基）の存在又は非存在下に、-20~100℃で反応を行う。使用される溶媒は、反応に関与しなければ特に限定されないが、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテルなどのエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミドなどのアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、ベンゼン、トルエンなどの炭化水素類、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン化炭化水素類、又はこれらの混合溶媒を挙げる事ができる。この際、添加剤（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド等）を加えることもできる。反応時間は、原料及び縮合剤の種類、反応温度等によって異なるが、通常、30分~24時間が適当である。化合物B及び縮合剤の使用量は、化合物Aに対して1~3倍モル量が好ましい。化合物Aの反応性誘導体として、例えば酸ハライドを用いる場合は、ピリジン、4-メチルピリジンなどのピリジン系溶媒又は前記と同じ塩基と溶媒を使用し、-20~100℃で反応を行う。また、添加物として、例えば4-ジメチルアミノピリジンを加えることもできる。反応時間は、使用する酸ハライドの種類、反応温度によって異なるが、通常、30分~24時間が適当である。

## 【0036】

菌産生物の誘導体であるエステル体、ヒドロキシメチル体、アルコキシメチル体は、公知の方法により容易に製造することができる。

## 【0037】

本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体はそのまま医薬として用いることができるが、医薬上許容される塩を形成する場合は、塩の形にして用いることもできる。このような塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、燐酸などの鉱酸の塩、酢酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸、フマル酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸などの有機酸の塩、又は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、水酸化アンモニウム等の無機塩基、メチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン、グアニジン、コリン、シンコニン等の有機塩基、リジ

ン、アルギニン、アラニン等のアミノ酸との塩などを挙げることができる。

【0038】

例えば、本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体の塩酸塩は、本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体を塩化水素のアルコール溶液、酢酸エチル溶液又はエーテル溶液に溶解することにより得ることができる。

【0039】

なお、本発明においては各化合物の含水物、水和物及び溶媒和物も包含される。

【0040】

本発明化合物を医薬として投与する場合、本発明化合物は、そのまま又は医薬上許容され得る無毒性かつ不活性の担体中に、例えば 0.1~99.5%、好ましくは 0.5~90%を含有する医薬組成物として、人を含む哺乳動物に投与することができる。

【0041】

担体としては、固形、半固形又は液状の希釈剤、充填剤及びその他の処方用の助剤一種以上が用いられる。医薬組成物は、投与単位形態で投与することが望ましい。本発明にかかる医薬組成物は、静脈内投与、経口投与、組織内投与、局所投与（経皮投与など）又は経直腸的に投与することができる。これらの投与方法に適した剤型で投与されるのはもちろんである。

【0042】

ICAM-1発現抑制剤、炎症性疾患治療剤、細胞増殖抑制剤としての用量は、病気の性質と程度、年齢、体重などの患者の状態、投与経路などを考慮した上で設定することが望ましいが、通常は、成人に対して本発明化合物の有効成分量として、1日あたり、0.1~1000mg/ヒトの範囲、好ましくは 1~500mg/ヒトの範囲が一般的である。

【0043】

場合によっては、これ以下で足りるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また1日2~3回に分割して投与することもできる。

【実施例1】

【0044】

以下に参考例、実施例、試験例及び製剤例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

参考例1

エステル体のR-MTPAエステル

実施例2で得られた化合物32 mgをピリジン1 mlに溶解し、室温攪拌下、(S)-(+)- $\alpha$ -メトキシ- $\alpha$ -(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド((S)-(+)-MTPAクロリド) 51mgを滴下した。室温で14時間攪拌後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ワコーゲルC-200、和光純薬製、3 g）で精製し、目的化合物39 mgを無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.80[3H, d], 0.89[3H, d], 0.95[3H, d], 1.07[1H, q], 1.16[1H, q], 1.59[1H, m], 1.70[1H, m], 1.81[1H, m], 1.87[1H, m], 1.91[3H, d], 2.20[1H, m], 2.47[1H, td], 3.55[3H, s], 3.75[3H, s], 4.60[1H, t], 5.44[1H, dt], 5.61[1H, ddd], 6.09[1H, dd], 6.23[1H, dd], 7.16[1H, dd], 7.40[3H, m], 7.61[2H, m]

参考例2

エステル体のS-MTPAエステル

実施例2で得られた化合物32 mgをピリジン1 mlに溶解し、室温攪拌下、(R)-(-)- $\alpha$ -メトキシ- $\alpha$ -(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド((R)-(-)-MTPAクロリド) 51mgを滴下した。室温で14時間攪拌後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ワコーゲルC-200、和光純薬製、3 g）で精製し、目的化合物32 mgを無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.80[3H, d], 0.89[3H, d], 0.96[3H, d], 1.05[1H, q], 1.17[1H, q], 1.61[1H, m], 1.68[1H, m], 1.79[1H, m], 1.83[1H, m], 1.93[3H, d], 2.22[1H, m], 2.49[1H, td], 3.53[3H, s], 3.76[3H, s], 4.61[1H, t], 5.44[1H, dt], 5.61[1H, ddd], 6.11[1H, dd], 6.25[1H, d], 7.18[1H, dd], 7.40[3H, m], 7.61[2H, m]

#### 実施例 1

##### 化合物 A

##### (1) 菌の採取

日本国大阪府茨木市のリターより分離した NFS-932 株 (受託番号: FERM P-19500、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター) を使用した。各種培地上での孢子形成、菌糸形態、生育速度、色調などから既報告菌との比較を行い、本生産菌を *Trichoderma* 属に属する不完全菌の一種であると同定した。

##### (2) NFS-932 株の培養

ジャガイモ・ショ糖寒天培地上に生育させた NFS-932 株の小片を、滅菌した加工大麦「はつらつ (はくばく製)」10 g 及び蒸留水 5 ml の入った三角フラスコに植菌し、24 °C で一週間静置して前培養とした。次いでこの培養物を、滅菌した加工大麦 250 g 及び蒸留水 25 ml の入ったシャーレに種菌として加えてよく混合し、24 °C で 3 週間静置して本培養とした。

##### (3) 化合物 A の単離精製

加工大麦培養物 1 kg にメタノール 3 L を加え、ホモジナイザーで粉碎・抽出した後、吸引濾過した。濾液に等量の水を加え、吸着カラムクロマトグラフィー (ダイヤイオン HP-20、三菱化成製、250 ml) に供した。吸着物を、40、60、80、100% メタノール/水各 1 L で溶出し、このうち 80% 及び 100% メタノール/水溶出画分を合わせて減圧乾固した (3.46 g)。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ワコーゲル C-200、和光純薬製、170 g) に供した。クロロホルム中のメタノール濃度を段階的に上げて展開し、1~2% メタノール/クロロホルム溶出画分を集めて減圧乾固した (0.54 g)。残渣を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ワコーゲル C-200、和光純薬製、25 g) に供し、ヘキサン中の酢酸エチル濃度を段階的に上げて展開した。活性画分の一部を減圧乾固し (0.07 g)、残渣を高速液体クロマトグラフィー (カプセルパック C<sub>18</sub> UG80、250×20mm I.D.、資生堂製) にて精製した。分取画分をそのまま静置することにより結晶を析出させ、これを濾取・乾燥することにより、目的化合物を無色結晶として得た (0.03 g)。

#### 【0045】

性状: 無色結晶

融点: 216.0~218.6 °C

溶解性: メタノール・クロロホルム・アセトンに可溶  
水・ヘキサンに不溶

R<sub>f</sub> 値 (TLC アルミニウムシート、シリカゲル 60 F<sub>254</sub>、メルク製):

トルエン-酢酸エチル-90% 酢酸 (5:4:1) 0.66

クロロホルム-アセトン-2-プロパノール (85:15:20) 0.72

分子式: C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>

元素分析値 (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> として):

計算値 (%) C: 74.96 H: 9.27

実測値 (%) C: 74.79 H: 9.27

EI-MS (M<sup>+</sup>): m/z 304

比旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +58.71^\circ$  (c 0.998, CH<sub>3</sub>OH)

IR (KBr):  $\nu$  1667 cm<sup>-1</sup>

#### 実施例 2

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸メチル

化合物 A 100 mg をテトラヒドロフラン-メタノール (4:1) 2 ml に溶解し、室温攪拌下、トリメチルシリルジアゾメタン (2.0 M ヘキサン溶液) 197  $\mu$ l を滴下して、室温で 1.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ワコ-ゲル C-200、和光純薬製、6 g) で精製し、目的化合物 105 mg を無色結晶として得た。

【0046】

融点: 54~57  $^{\circ}\text{C}$

元素分析値 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$  として):

計算値 (%) C: 75.43 H: 9.50

実測値 (%) C: 75.10 H: 9.44

比旋光度:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +71.64^{\circ}$  (c 0.469,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

IR (KBr):  $\nu$  1709  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.95[3H, d], 0.96[1H, q], 1.04[3H, d], 1.08[3H, d], 1.08[1H, q], 1.32[1H, m], 1.52[1H, m], 1.75[1H, dt], 1.85[1H, m], 1.93[3H, d], 2.20[1H, m], 2.49[1H, t, d], 2.74[1H, t], 3.75[3H, s], 5.44[1H, dt], 5.59[1H, ddd], 6.14[1H, dd], 6.27[1H, dd], 7.20[1H, dq]

#### 実施例 3

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン-1-オール

水素化リチウムアルミニウム 37 mg をテトラヒドロフラン 2 ml に懸濁し、系内をアルゴン置換した。室温攪拌下、化合物 A 200 mg のテトラヒドロフラン溶液 2 ml を 10 分間かけて滴下し、24 時間加熱還流した。反応液を氷冷後、水 0.37 ml、15% 水酸化ナトリウム水溶液 0.37 ml、水 1.11 ml を順次滴下し、氷浴をはずして、灰色の不溶物が白色になるまで室温で 30 分間攪拌した。不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮した残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100B、富士シリシア製、20 g) で精製し、目的化合物 124 mg を無色アモルファスとして得た。

【0047】

元素分析値 ( $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2 \cdot 0.7\text{H}_2\text{O}$  として):

計算値 (%) C: 75.30 H: 10.44

実測値 (%) C: 75.26 H: 9.94

比旋光度:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +15.11^{\circ}$  (c 0.900,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0.82[1H, q], 0.89[3H, d], 0.93[3H, d], 0.96[1H, m], 1.00[3H, d], 1.14[1H, m], 1.34[1H, m], 1.65[1H, dt], 1.65[3H, s], 1.78[1H, m], 2.08[1H, m], 2.33[1H, dd], 2.43[1H, dd], 3.83[2H, d], 4.36[1H, d], 4.76[1H, t], 5.39[1H, d], 5.55[1H, ddd], 5.67[1H, dd], 5.99[1H, dd], 6.18[1H, dd]

#### 実施例 4

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエニル=メチルエーテル

実施例 3 で得られた化合物 85 mg をテトラヒドロフラン 2 ml に溶解し、ヨウ化メチル 22  $\mu$ l 及び 60% 水素化ナトリウム 29 mg を順次添加して、室温で 24 時間攪拌した。反応液に水を加えて酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100B、富士シリシア製、10 g) で精製し、目的化合物 62 mg を無色油状物として得た。

【0048】

元素分析値 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$  として):

計算値 (%) C: 78.43 H: 10.60

実測値 (%) C: 78.21 H: 10.61

比旋光度:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +10.94^{\circ}$  (c 0.457,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )



$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.94[1H, q], 0.94[3H, d], 1.04[3H, d], 1.10[3H, d], 1.27[1H, m], 1.36[1H, m], 1.50[1H, m], 1.75[1H, dt], 1.75[3H, d], 1.86[1H, m], 2.17[1H, m], 2.41[1H, d dd], 2.73[1H, t], 3.31[3H, s], 3.85[2H, s], 5.42[1H, dt], 5.59[1H, ddd], 5.74[1H, dd], 6.02[1H, dq], 6.17[1H, dd]

#### 実施例 5

N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

化合物 A 3.04 g を N, N-ジメチルホルムアミド 45 ml に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 2.11 g 及び 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール 1.84 g を添加して、室温で 30 分間攪拌した。室温攪拌下、次いで 3-(アミノメチル)ピリジン 1.19 g の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 5 ml 及び トリエチルアミン 3 ml を順次滴下した。室温で 18 時間攪拌後、反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。得られた粗結晶を酢酸エチルで洗浄し、目的化合物 2.85 g を無色結晶として得た。

【0049】

融点: 163~164 °C

元素分析値 ( $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2$  として):

計算値 (%) C: 76.10 H: 8.69 N: 7.10

実測値 (%) C: 75.84 H: 8.67 N: 7.02

比旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +76.69^\circ$  (c 1.103,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

IR (KBr):  $\nu$  1653  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$   $\delta$ : 0.84[1H, q], 0.91[3H, d], 0.94[3H, d], 1.01[3H, d], 1.02[1H, q], 1.18[1H, m], 1.37[1H, m], 1.67[1H, dt], 1.80[1H, t], 1.89[3H, s], 2.12[1H, m], 2.44[1H, m], 2.46[1H, m], 4.35[2H, d], 4.38[1H, d], 5.42[1H, dd], 5.56[1H, ddd], 6.05[1H, dd], 6.31[1H, dd], 6.87[1H, d], 7.33[1H, dd], 7.66[1H, dt], 8.41[1H, d], 8.44[1H, dd], 8.49[1H, d]

実施例 5 と同様にして、以下の化合物を合成した。

#### 実施例 6

N-(ピリジン-4-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

#### 実施例 7

N-(ピリジン-2-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

#### 実施例 8

N-ベンジル-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

#### 実施例 9

N-(3-メトキシベンジル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例 10

N-(4-クロロベンジル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 11

N-(4-メチルベンジル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 12

N-[4-(N',N'-ジメチルアミノ)ベンジル]-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 13

N-(ピリジン-4-イルエチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 14

N-(4-ヒドロキシフェネチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 15

N-(フェニルブチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 16

N-フェニル-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 17

N-メチル-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 18

N-(n-ブチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 19

N-(t-ブチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

## 実施例 20

N,N-ジメチル-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1

, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

#### 実施例 2 1

N-ベンジル-N-メチル-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

#### 実施例 2 2

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

#### 試験例 1

##### ICAM-1発現抑制試験 (Enzyme Immuno Assay, EIA)

培養培地に血管内皮細胞用血清含有液体培地 (日水製薬製) を用い、HUVEC (臍帯静脈血管内皮細胞、森永生科学研究所製) を定法によりコラーゲン処理フラスコ内で培養した。

#### 【0050】

HUVECに対するICAM-1の発現抑制テストを行う際には、コラーゲン処理96穴プレートを用いて、HUVECを $1 \sim 2 \times 10^4$  cells/well、 $100 \sim 200 \mu\text{l}$  medium/wellの条件で、48~72時間培養した。試験溶液を添加する前に培地 ( $80 \mu\text{l}$ ) を交換し、予め希釈しておいた試験溶液を $10 \mu\text{l}$ 添加して、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置した。2時間後に顕微鏡下で細胞の形態観察をした後、TNF- $\alpha$  (組換えヒトTNF- $\alpha$ 、Genzyme製) を $10 \mu\text{l}$ 添加し (最終濃度0.3 ng/ml)、再びCO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置した。16~22時間後に顕微鏡下で細胞の形態観察を行い、1%パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定した。Ca<sup>2+</sup> 及びMg<sup>2+</sup> 含有リン酸緩衝液で細胞を洗浄し、続いて抗ICAM-1抗体 (マウスIgG1、協和メディックス製) を室温で30分間作用させた。再度リン酸緩衝液で細胞を洗浄した後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(H+L) (Organon Teknik Corp. 製) でさらに30分間処理した。再度リン酸緩衝液で細胞を洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色キット (住友ベークライト製) を用いて発色量を測定し、HUVEC上に発現したICAM-1をコントロールに対する発現阻害率 (%) として求め、IC<sub>50</sub> 値を算出した。その結果を表2に示す。

#### 【0051】

【表 2】

表 2 ICAM-1 発現抑制試験

被験薬物	IC <sub>50</sub> (× 10 μM)
実施例 1	5.9
実施例 2	0.067
実施例 3	0.99
実施例 4	0.22
実施例 5	0.017
実施例 6	0.059
実施例 7	0.20
実施例 8	0.047
実施例 9	0.21
実施例 10	1.4
実施例 11	1.6
実施例 12	3.2
実施例 13	0.57
実施例 14	1.5
実施例 16	1.5
実施例 17	0.26
実施例 18	0.24
実施例 19	1.5
実施例 20	0.14
実施例 21	0.49
実施例 22	0.88

表 2 に示す通り、本発明化合物が ICAM-1 発現抑制作用を有していることは明らかである。  
。試験例 2

#### メチル化ヒト血清アルブミン誘導遅延型過敏反応試験 (MeHSA-DTH)

生理食塩液にメチル化ヒト血清アルブミン (MeHSA) を 5mg/ml で溶解し、等量の完全フロイントアジュバント (ヤトロン社製) と混合し、乳化剤を作製した。作製した乳化剤 100 μl を 8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスの皮下に注射することで抗原感作を行った。7 日後、生理食塩液に MeHSA を 1mg/ml で溶解し、マウスの右後肢足蹠皮下に 25 μl 注射することで反応を惹起した。反応惹起 24 時間後の足蹠の厚さを測定し、反応惹起前の厚さとの差を算出し、評価した。なお、薬物は反応惹起の 1 時間前および 16 時間後の 2 回経口投与した。その結果を表 3 に示す。

【0052】

【表3】

表3 メチル化ヒト血清アルブミン誘導遅延型過敏反応試験

被験薬物	用量 (mg/kg)	抑制率 (%)
実施例 5	10	27.5 *
NSF-932 No. 41	30	51.5 **
実施例 6	10	27.8 *
NSF-932 No. 42	30	35.7 **

\* :  $P < 0.01$ , \*\* :  $P < 0.05$  (ダネット検定)

表3に示す通り、本発明化合物がリンパ球浸潤による炎症性疾患の治療に有用であることは明らかである。

## 試験例 3

## マウスコラーゲン関節炎モデルを用いた試験

ウシ関節由来ⅠⅠ型コラーゲンを 2mg/ml の濃度になるように 0.1M 酢酸生理食塩溶液に溶解し、完全フロイントアジュバント (ヤトロン社製) と等量混合し、乳化剤を作製した。雄性 DBA/1J マウス (8週齢、オス) の尾根部皮内に注射して一次感作を行い 21 日後、同様に調製した乳化剤 0.1 ml をマウス背部皮内に注射して二次感作を行い、関節炎を発症させた。二次感作から 2 週間後、関節炎症状を肉眼的に観察した (0: 正常、1: 指先の腫脹・発赤、2: 足蹠部の腫脹・発赤、3: 全ての指先および足蹠部の腫脹・発赤)。関節炎症状は四肢それぞれについて観察し、その合計を個体の関節炎スコアとした。なお、被験薬物は 0.5% メチルセルロースに懸濁し、二次感作以降、連日経口投与した。その結果を表4に示す。

【0053】

【表4】

表4 マウスコラーゲン関節炎モデルを用いた試験

被験薬物	用量 (mg/kg)	例数	関節炎スコア
control	—	10	5.7
実施例 5	30	9	2.1 *

\* :  $P < 0.05$  (ウィルコクソン順位和検定)

表4に示す通り、本発明化合物が関節リウマチの治療に有用であることは明らかである。

次に、本発明化合物が細胞増殖抑制作用を有しているか否かについて検討を行った。

## 試験例 4

## 細胞増殖抑制試験

各種癌細胞及び正常細胞は、培養液中で培養した70~90%コンフルエント状態のものを使用した。培養液を除去後、0.25%トリプシン/1mM-EDTA溶液を加えて細胞を剥離し、細胞数を計測した後、 $5 \times 10^4$  cells/mlの細胞懸濁液を調製した。これを96穴プレートに90  $\mu$ l/wellずつ分注し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置した。翌日、0~10  $\mu$ Mの被験薬物 (実施例5の化合物) を10  $\mu$ l/wellずつ添加し、穏やかに振盪して培養液と十分に混合させた。3日間培養後、5 mg/ml MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテト

ラゾリウム プロミド) 水溶液10  $\mu$ lずつを添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内でさらに4時間培養後、0.04 N塩酸を含む2-プロパノール溶液100  $\mu$ lを各ウェルに添加して反応を停止した。生成したMTTホルマザンをマルチチャンネルピペットで十分に溶解し、655 nmを対照光として、595 nmの吸光度を測定した。測定した吸光度について、MTT法のモデル式を用いて非線形回帰分析を行い、細胞増殖を50%阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。本試験に用いた細胞、及びその培養液は下記の通りである。

- 1) 細胞 : A549 (ヒト肺癌細胞、財団法人ヒューマンサイエンス)  
培養液: DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地) +10%FBS (ウシ胎児血清)
- 2) 細胞 : PC-3 (ヒト肺前立腺癌細胞、ATCC)  
培養液: DMEM+10%FBS
- 3) 細胞 : AsPC-1 (ヒト膵癌細胞、東京大学)  
培養液: DMEM+10%FBS
- 4) 細胞 : HT-1080 (ヒト繊維肉腫細胞、ATCC)  
培養液: DMEM+10%FBS
- 5) 細胞 : Hepatocyte (正常ヒト肝細胞、ACRBI)  
培養液: CS-C (セルシステムズ社製)
- 6) 細胞 : NHDF (正常ヒト繊維芽細胞、クラボウ)  
培養液: DMEM+10%FBS
- 7) 細胞 : BAE (正常ウシ大動脈血管内皮細胞、ACRBI)  
培養液: CS-C (セルシステムズ社製)

試験結果を表5に示す。

【0054】

【表5】

表5 細胞増殖抑制試験

細胞	IC <sub>50</sub> (nM)
A549 (ヒト肺癌細胞)	85
PC-3 (ヒト肺前立腺癌細胞)	67
AsPC-1 (ヒト膵癌細胞)	113
HT-1080 (ヒト繊維肉腫細胞)	70
Hepatocyte (正常ヒト肝細胞)	430
NHDF (正常ヒト繊維芽細胞)	600
BAE (正常ウシ大動脈血管内皮細胞)	9400

表5に示す通り、実施例5の化合物は正常細胞よりヒト由来癌細胞に対してより強い増殖抑制作用を示した。この結果より、本発明化合物が細胞増殖抑制剤として有用であることは明らかである。

製剤例1

錠剤 (内服錠)

処方1錠80mg 中

実施例1の化合物	5.0mg
トウモロコシ澱粉	46.6mg
結晶セルロース	24.0mg
メチルセルロース	4.0mg
ステアリン酸マグネシウム	0.4mg

この割合の混合末を通常の方法により打錠成形し内服錠とする。

製剤例2

## 錠剤 (内服錠)

処方 1 錠 80mg 中

実施例 2 の化合物	5.0mg
トウモロコシ澱粉	46.6mg
結晶セルロース	24.0mg
メチルセルロース	4.0mg
ステアリン酸マグネシウム	0.4mg

この割合の混合末を通常の方法により打錠成形し内服錠とする。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0055】

本発明化合物は、ICAM-1の発現を抑制することから、ICAM-1発現阻害剤、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤として有用である。また、本発明化合物は、細胞増殖を抑制することから、細胞増殖抑制剤として有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0056】

【図1】化合物AのHMQCスペクトルを表す。縦軸はH、横軸はCである。

【図2】化合物Aの平面構造及びNMR相関シグナルを模式的示した図である。実線及び点線は、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSYにより決定した平面構造部位を示す。矢印は、HMBCスペクトルにより相関が認められた個所である。

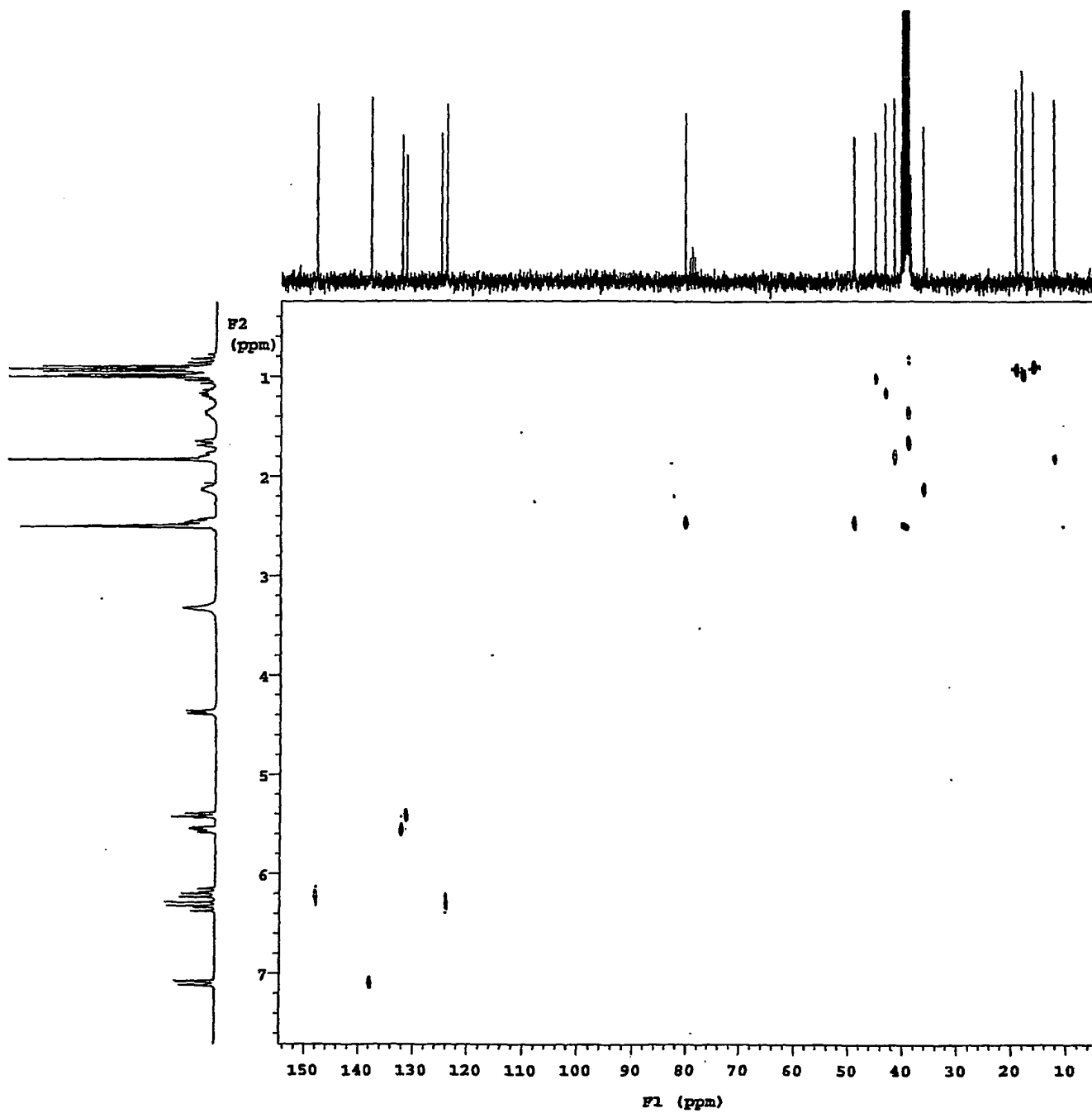
【図3】化合物AのHMBCスペクトルを表す。縦軸はH、横軸はCである。

【図4】エステル体のNOESYスペクトル表す。縦軸、横軸ともにHである。

【図5】エステル体の相対立体構造とNOE相関を表す。矢印は、NOEが観測された個所である。

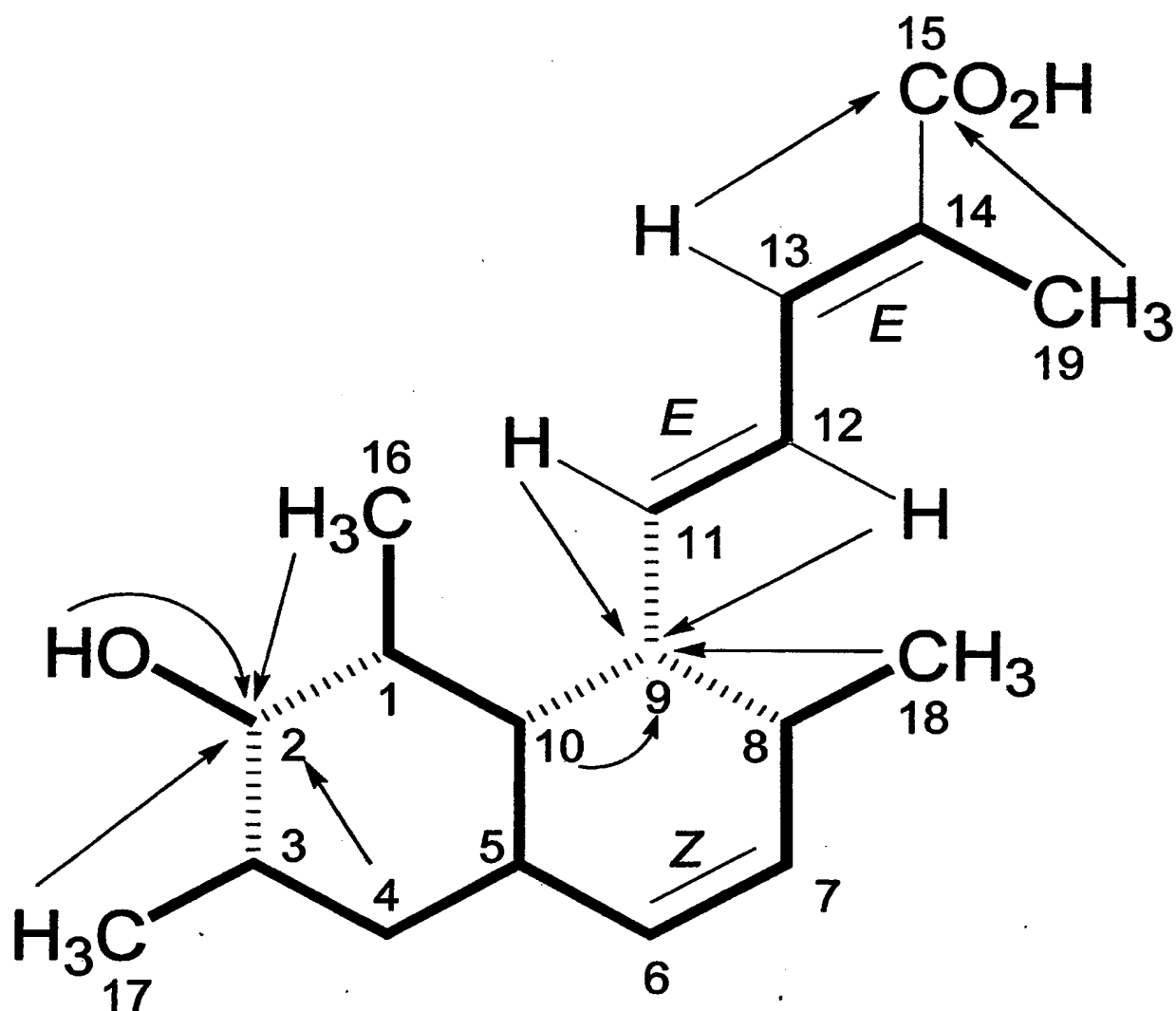
【図6】エステル体のMTPAエステルの $\Delta\delta$  ( $= \delta_S - \delta_R$ ) 値と絶対立体構造を表す。実線は、MTPA平面を示す。

【書類名】図面  
【図 1】





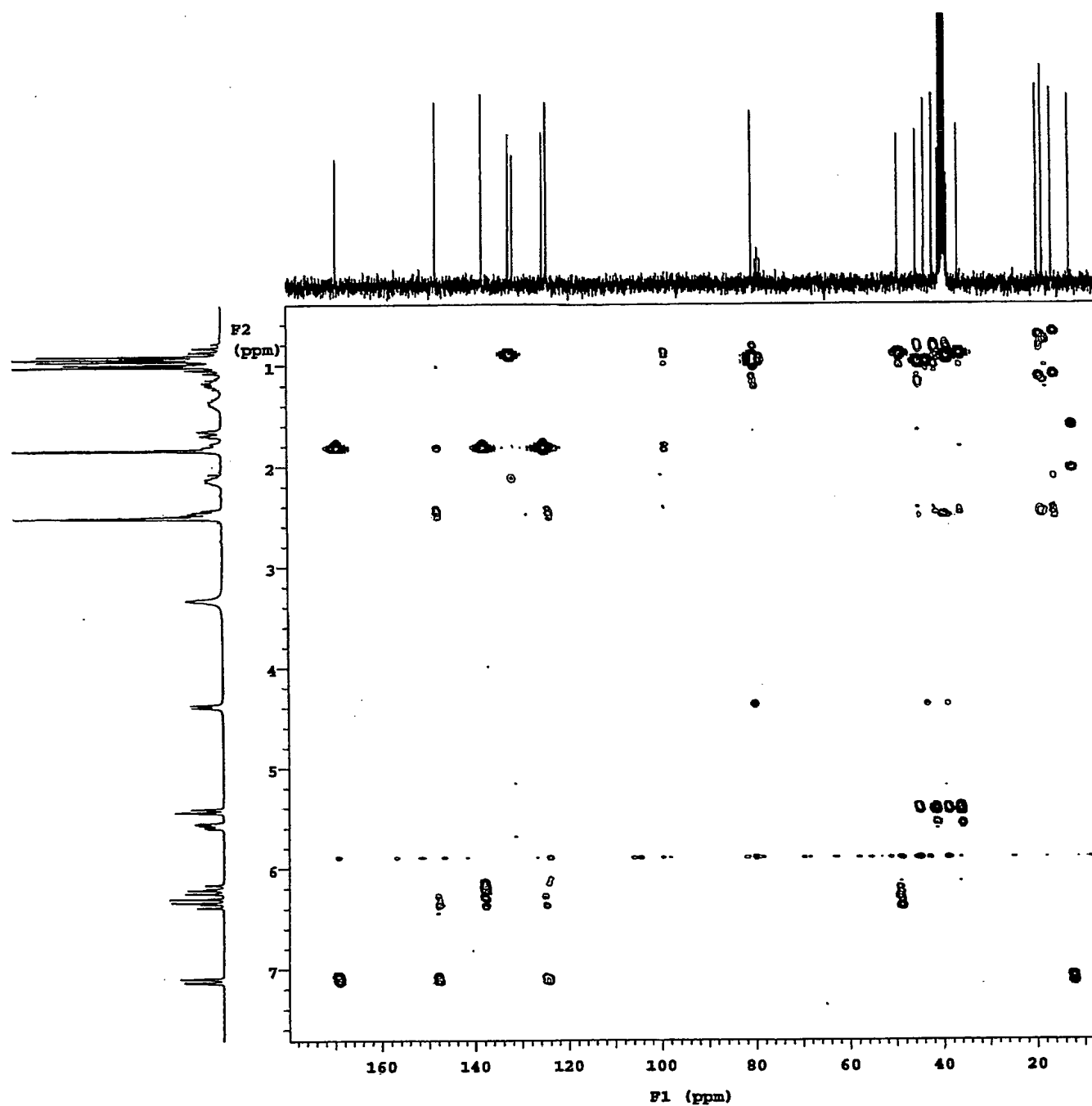
【図 2】



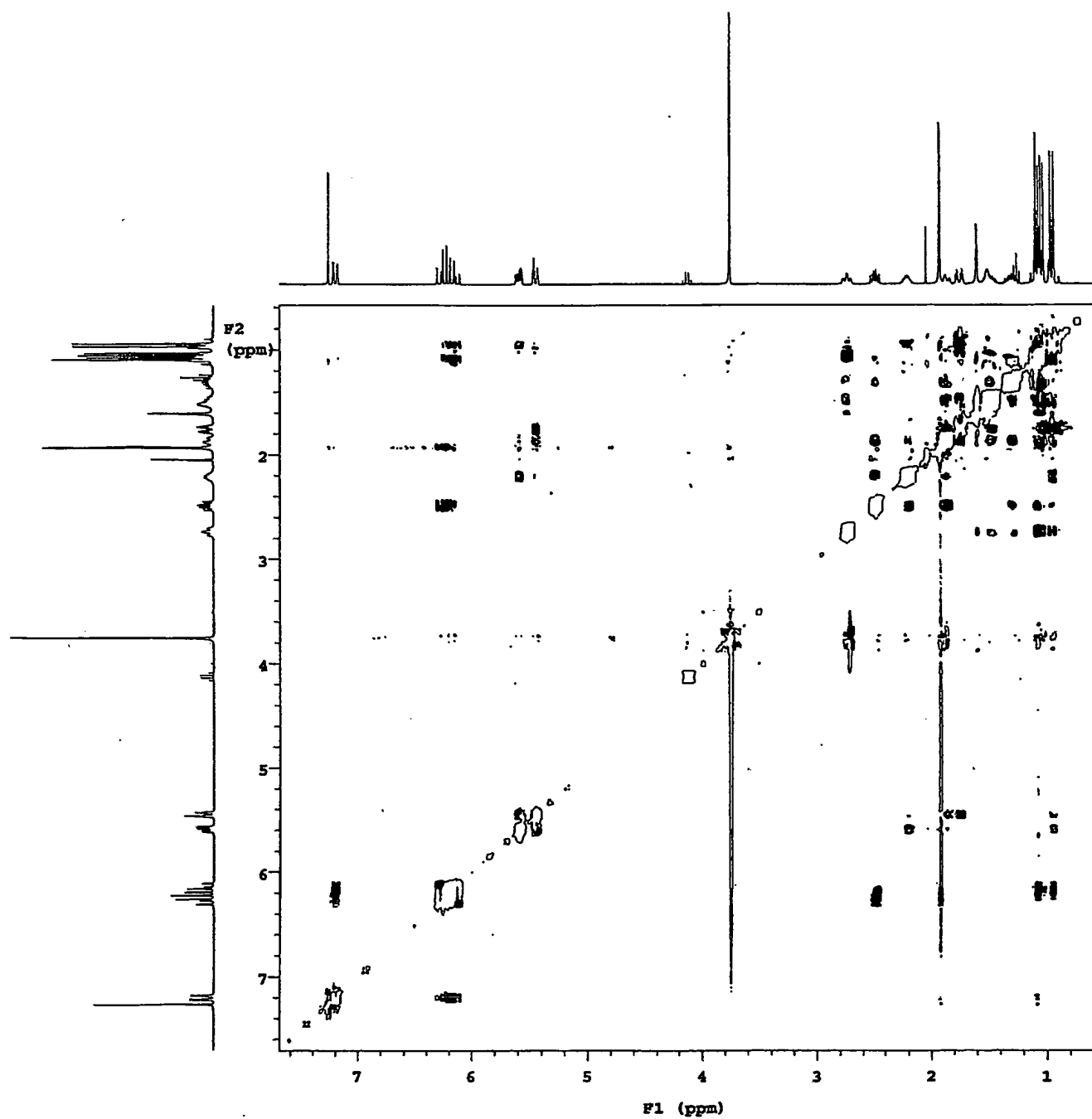
— } <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY  
..... }

→ HMBC

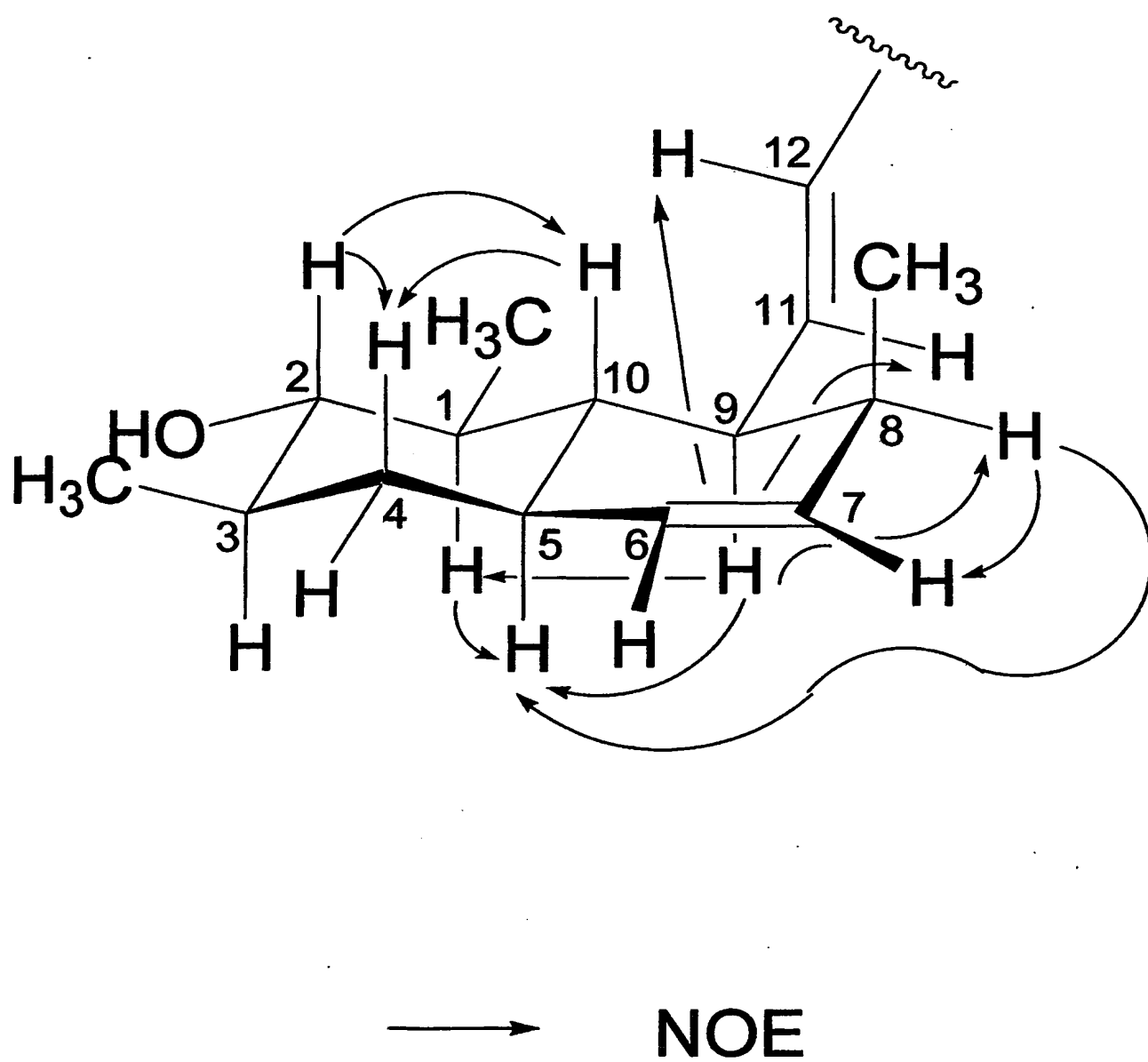
【図 3】



【図 4】



【図 5】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の目的は、ICAM-1発現阻害作用を有するオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を提供することにある。

【解決手段】 本発明として、例えば、N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミドを有効成分として含有するICAM-1発現阻害剤、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤、細胞増殖抑制剤を挙げることができる。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-435677
受付番号	50302153946
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 2月 6日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000004156
【住所又は居所】	京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地
【氏名又は名称】	日本新薬株式会社

## 【代理人】

申請人

【識別番号】	100104802
【住所又は居所】	京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地
【氏名又は名称】	日本新薬株式会社 特許部

清水 尚人

## 【代理人】

【識別番号】	100126446
【住所又は居所】	京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地
【氏名又は名称】	日本新薬株式会社 知的財産部

梶井 康司

特願 2003-435677

出願人履歴情報

識別番号

[000004156]

1. 変更年月日

1990年 8月13日

[変更理由]

新規登録

住所

京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地

氏名

日本新薬株式会社



# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019402

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-435677  
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse